

PCT/EP 03/07487

Mod. C.E. - 1-4-7

10-203

MODULARE  
100-101

REC'D 15 AUG 2003  
WIPO PCT

# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività  
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 15 AUG 2003  
WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

N.

MI2002 A 001527

Invenzione Industriale

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'acciuso processo verbale di deposito.

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

24 GIU. 2003



Roma, II

IL DIRIGENTE

Elena Marinelli  
Sign. E. MARINELLI



2728PTIT

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MT2002A 001527 REG. A  
NUMERO BREVETTO       

DATA DI DEPOSITO 11/07/2002  
DATA DI RILASCIO       /      /      

D. TITOLO

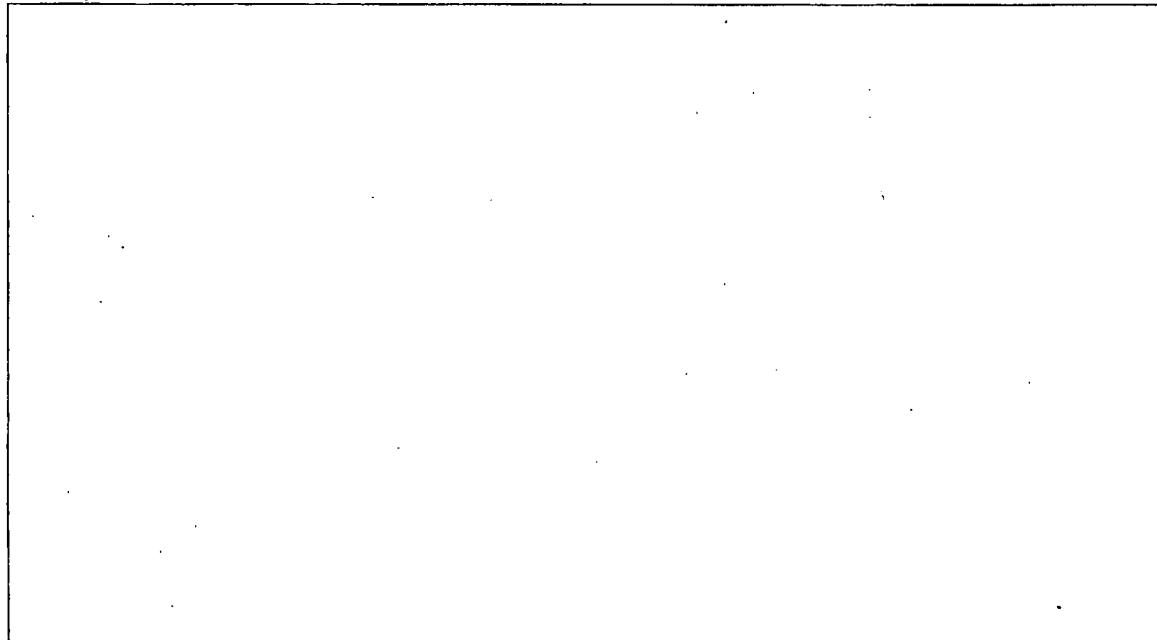
Anticorpi anti componente C5 del complemento e loro uso

L. RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda anticorpi ricombinanti di origine umana avente specificità per il componente C5 del complemento attivato e caratterizzati dal fatto di inibire la conversione della catena C5 alfa in C5a e C5b. L'invenzione riguarda inoltre le sequenze nucleotidiche codificanti per tali anticorpi e l'uso terapeutico sia delle sequenze polipeptidiche che di quelle nucleotidiche, in particolare per la cura di patologie legate a danni tessutali derivanti da attivazione incontrollata del sistema del complemento.



M. DISEGNO



Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

“Anticorpi anti componente C5 del complemento e loro uso.

a nome di: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE (90%)

con sede in: TRIESTE

a nome di: CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE (10%)

con sede in: ROMA

Inventori designati : TEDESCO Francesco, MARZARI Roberto

\*\*\*\*\*

**CAMPO DELL'INVENZIONE**

**MI 2002 A 001527**

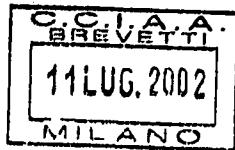
**TECNICA ANTERIORE**

L'attivazione del sistema del complemento (sistema C) costituisce un meccanismo importante nella difesa immunitaria. Contemporaneamente rappresenta un'arma a doppio taglio, in quanto se da un lato garantisce la protezione dell'ospite, dall'altro è in grado di danneggiare i tessuti dove il complemento viene attivato in diverse situazioni patologiche.

L'aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche ed alle malattie autoimmuni osservata in pazienti con defezienze ereditarie del sistema C è una chiara dimostrazione dell'importanza di questo sistema particolarmente nella protezione dell'ospite da agenti infettivi e nell'eliminazione degli immunocomplessi.

Le funzioni protettive si sviluppano in seguito all'attivazione del complemento che in cascata genera prodotti biologicamente attivi.

Alcuni di questi, come C1q, C3b e C3bi, opsonizzano gli agenti infettivi, permettendone l'eliminazione. Altri invece, quali C5a e C5b67, hanno funzione di reclutamento dei fagociti nel sito di infiammazione, oppure



BB

lisano bersagli sensibili, come nel caso del complesso di attacco alla membrana (MAC). Purtroppo queste molecole, una volta prodotte, non sono in grado di discriminare tra bersagli endogeni ed esogeni e possono pertanto provocare gravi danni a cellule e tessuti nel caso in cui questi non siano protetti da potenti inibitori espressi in membrana o presenti a livello extracellulare e che intervengono a vari livelli della cascata di attivazione complementare. Tuttavia, quando l'attivazione del sistema C è massiva, come nel caso di gravi processi infettivi o di patologie autoimmuni, l'azione degli inibitori viene neutralizzata ed il complemento attivato causa distruzione di cellule e tessuti.

Il frammento C5a ed il complesso terminale C (TCC) sono due dei prodotti coinvolti nella distruzione tissutale in molti processi infiammatori. Livelli di questi prodotti di attivazione superiori al normale sono riscontrabili nel liquido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide e nel liquido encefalo-rachidiano di pazienti con varie patologie del sistema nervoso centrale. Elevati livelli di C5a sono anche stati trovati in pazienti politraumatizzati e con danni da ischemia e ripercuzione miocardica.

E' quindi ormai riconosciuto il ruolo del C5a nello sviluppo di queste patologie. Lo dimostra il fatto che animali trattati per via endovenosa con questa anafilottossina mostrano segni di sofferenza polmonare, ipotensione e leucopenia. L'instillazione bronchiale di C5a è inoltre in grado di indurre spiccate reazioni infiammatorie nel polmone di coniglio.

Il TCC si forma a partire dal frammento C5b, che si libera per scissione enzimatica del C5 ad opera della C5 convertasi. Recentemente, è stato dimostrato che il TCC induce infiammazione a causa dei danni tissutali



indotti dalla sua attività litica e dei numerosi effetti non citotossici su fagociti ed altre cellule.

Il TCC è stato localizzato in vari tessuti in diverse situazioni patologiche che comprendono: artrite reumatoide, glomerulopatie, sclerosi multipla, neuropatie periferiche demielinizzanti, arterosclerosi ed infarto miocardico. Lo sviluppo di modelli sperimentali per queste patologie in animali con defezienze selettive nei componenti C tardivi ha ulteriormente contribuito a definire il ruolo di questi componenti nello sviluppo del danno tissutale.

Dato il ruolo fondamentale svolto dal C5a e dal TCC nel promuovere l'infiammazione cronica ed il danno tissutale, numerosi tentativi sono stati effettuati per neutralizzare i componenti terminali del complesso C come meccanismo terapeutico per prevenire tali complicanze in patologie associate all'attivazione del C5. Questa molecola risulta essere un bersaglio terapeutico ideale, in quanto la sua neutralizzazione inibisce l'attivazione della sequenza terminale di eventi di attivazione della cascata, senza interferire con l'attività di opsonizzazione dei primi componenti della cascata. Anticorpi monoclonali murini specifici per il C5 umano, murino e di ratto, ed in grado di inibire la produzione di C5a e di complesso di attacco alla membrana (MAC) sono già commercialmente disponibili. Anticorpi anti-C5 sono stati utilizzati con successo nel topo, per prevenire lo sviluppo di artrite indotta da collagene e per migliorare il decorso clinico della glomerulonefrite e, nei ratti, per ridurre l'ischemia miocardica e la riparazione.

Negli ultimi anni sono stati prodotti due anticorpi a catena singola (single



chain antibody o single chain fragment variable, scFv), entrambi descritti nella domanda di brevetto WO 95/29697. Si tratta di anticorpi capaci di una penetrazione più rapida nei tessuti rispetto all'anticorpo intero. Il primo anticorpo a catena singola è stato ottenuto mediante assemblaggio delle regioni variabili di un anticorpo murino per il C5 e mantiene la capacità dell'anticorpo originario di inibire l'assemblaggio del MAC e di bloccare parzialmente la produzione di C5a (Evans, M. J et al, 1995, *Mol. Immunol.* 32:1183). Questo anticorpo è inoltre in grado di impedire il deposito di C5b-9 nel cuore ripercorso con plasma umano o nell'insufficienza cardiaca. Il secondo scFv è un anticorpo murino anti-C5 umanizzato, cioè ottenuto mediante inserimento delle regioni CDR (complementarity determining region) murine nella struttura della regione variabile delle catene leggere e pesanti umane. Questo anticorpo (Thomas, T. C. et al., 1996, *Mol. Immunol.* 33:1389) è in grado di inibire la formazione di C5a e di C5b-9, sebbene l'epitopo riconosciuto da questo anticorpo, mappato nell'intorno degli amminoacidi 860-865 della molecola C5 e corrispondente al peptide KSSKC, risulti lontano dalla sequenza di taglio della C5 convertasi. Studi successivi (Fitch, J. C. et al., 1999, *Circulation* 100:2499) hanno dimostrato che quest'anticorpo è inoltre in grado di inibire l'attività emolitica del complemento, di attenuare i danni del miocardio, i danni cognitivi e la perdita di sangue in un gruppo di pazienti con bypass cardiopolmonare.

#### SOMMARIO

Secondo un aspetto principale l'invenzione riguarda un anticorpo di origine umana avente specificità per il componente C5 del complemento



attivato e caratterizzato dal fatto di inibire la scissione della catena C5 alfa in C5a e C5b. In particolare, l'anticorpo è ricombinante e riconosce un epitopo comprendente il sito di proteolisi della C5 convertasi sulla catena alfa del componente C5 del complemento.

Secondo un aspetto preferito, l'anticorpo ricombinante è in formato a catena singola (scFv) comprendente una regione variabile della catena leggera unita covalentemente con una regione variabile della catena pesante e, secondo un aspetto ancor più preferito è costituito o comprende almeno una tra le sequenze amminoacidiche scelte tra: seq ID n° 2, 4, 6 o proteine aventi almeno il 95% di omologia con tali polipeptidi.

In accordo con un ulteriore aspetto l'invenzione comprende le sequenze nucleotidiche isolate codificanti per gli anticorpi aventi specificità per il componente C5 del complemento attivato e caratterizzati dal fatto di inibire la scissione della catena C5 alfa in C5a e C5b, in particolare le sequenze scelte tra: seqID n°1 o 3 o 5, ed i vettori comprendenti tali sequenze. Secondo un ulteriore aspetto, l'invenzione riguarda l'uso terapeutico degli anticorpi e delle sequenze nucleotidiche per la preparazione di farmaci per la prevenzione ed il trattamento di patologie legate ad un'attivazione incontrollata del sistema del complemento in particolare: artrite reumatoide, glomerulonefrite, sclerosi multipla, neuropatie periferiche demielinizzanti, aterosclerosi.

#### **DESCRIZIONE DELLE FIGURE**

**Figura 1. Valutazione della capacità dei cloni scFv TS-A12 e TS-A12/22 anti-C5 di inibire la formazione del frammento C5a mediante**



**saggio ELISA (pannello A) e mediante saggio di lisi eritrocitaria (pannello B).**

Pannello A) Il saggio ELISA misura la quantità del frammento C5a liberato nel sovraccorrente per scissione enzimatica di C5, utilizzando anticorpi anti-C5, come descritto nell'esempio 6. L'incubazione del C5 con gli anticorpi dell'invenzione TS-A12 e TS-A12/22 inibisce la formazione del frammento C5a. Alla miscela di TS-A12 o TS-A12/22 e C5 furono aggiunti eritrociti di montone sensibilizzati con anticorpi e rivestiti fino al C3b (EAC1-3b) e la miscela fu incubata per altri 30' a 37°C (pannello B). Come risulta dalla Figura 1 A e B gli anticorpi TS-A12 e TS-A12/22 inibiscono la scissione di C5 da parte della C5 convertasi ed inibiscono quindi la formazione di C5a (Pannello A) e di TCC (Pannello B).

Simboli: -▲ - : TS-A12/22; - ■ - scFv non correlato; - ♦ - TS-A12.

**Figura 2. Immunoblotting per identificare la catena di C5 riconosciuta da scFv TSA-12/22.**

Le catene alfa e beta del C5 sono state separate elettroforeticamente mediante SDS- PAGE su poliacrilamide al 10% e quindi trasferite su nitrocellulosa. L'immunoblot (corsie 1 e 2) è stato sviluppato con l'anticorpo TSA-12/22 e rivelato mediante incubazione con un anticorpo monoclonale anti-SV5 (SV5 tag) seguito da incubazione con un anticorpo di capra anti-IgG di topo marcato con fosfatasi alcalina. Corsia 1: 100 ng dalla catena  $\alpha$  di C5; corsia 2 100 ng della catena  $\beta$ ; corsia 3: miscela delle due catene. L'immunoblot della corsia 3, usato come controllo positivo, è stato sviluppato con un anticorpo di capra anti-C5

181

umano che riconosce sia la catena alfa che la catena beta coniugato con biotina seguito da avidina marcata con fosfatasi alcalina. Come si vede, l'scFv TSA-12/22 riconosce la catena alfa di C5 in corsia 1, ma non la beta in corsia 2.

**Figura 3. Inibizione del legame tra C5 e scFv dell'invenzione ad opera del peptide P5A-18 (KDMQLGRLHMKTLLPVSK) comprendente il sito di taglio della C5 convertasi.**

Miscele di scFv TSA-12/22 (1 µg/ml) contenenti 200, 400 e 800 ng del peptide P5A-18 (di sequenza KDMQLGRLHMKTLLPVSK, comprendente il sito di taglio della C5 convertasi), oppure contenenti 800 ng del peptide non correlato CS5 derivato dalla fibronectina (GEEIQIGHIPREDVDYHLYP), oppure contenenti 3.5 µg del frammento C5a, oppure contenenti soluzione fisiologica (controllo) furono incubate come descritto nell'esempio 8 e quindi il legame dell'anticorpo, preincubato nei vari modi, al C5 su fase solida, valutato con un saggio immunoenzimatico. L'inibizione del legame tra scFv dell'invenzione e C5 ad opera del peptide P5A-18 è dose-dipendente passando dal 45% al 90% a concentrazioni di peptide di 200 e 800 ng rispettivamente. Questi valori corrispondono ad una  $K_i$  per il peptide P5A-18 di 1µM. Non si osserva alcun tipo di inibizione usando C5a o il peptide non correlato.

**Figura 4. Inibizione dell'attività emolitica di C5 da parte dell'anticorpo TS-A12/22.**

Valori di lettura spettrofotometrica effettuata a 412 nm per la misura di inibizione della lisi di: emazie di montone caricate con EAC1-3b, tramite via classica di attivazione del complemento (Pannello A); o di eritrociti di



coniglio per misurare la via alternativa (Pannello B).

Quantità crescenti di C5 sono state miscelate con 600 ng dell'anticorpo scFv dell'invenzione oppure con un scFv non correlato, oppure con GVBS, in cui sono stati disciolti gli scFv dell'invenzione come descritto nell'esempio 9. Dopo incubazione con siero carente di C5 ottenuto da un paziente con difetto selettivo di questo componente complementare, fu misurata la percentuale di lisi eritrocitaria rispetto al 100% ottenuto lisando le emazie con ugual volume di H<sub>2</sub>O distillata ed al bianco ottenuto sospendendo le emazie in GBVS.

Simboli: -◆- : TS-A12/22; - ■ - scFv non correlato; - □- GVBS.

**Figura 5. Inibizione dell'attività emolitica di C5 in sieri di mammifero da parte dell'anticorpo TS-A12/22.**

Le misurazioni furono eseguite come descritto nell'esempio 8, utilizzando sieri di uomo (pannello A), ratto (pannello B), coniglio (pannello C), topo (pannello D).

Simboli: -▲ - : GVBS TS-A12/22; - ■ - scFv non correlato; -◆- : TS-A12/22.

**Figura 6. Inibizione della migrazione intraarticolare di leucociti polimorfonucleati (PMN) da parte dell'anticorpo TS-A12/22 in modelli di artrite indotta da antigene in ratto.**

Leucociti polimorfonucleati (PMN) isolati da lavaggio intraarticolare di ratti con artrite indotta da inoculi di BSA (mBSA) furono incubati con l'anticorpo TS-A12/22 o con un anticorpo non correlato, come descritto nell'esempio 10. Il numero di PMN nell'articolazione trattata con l'anticorpo dell'invenzione appare drasticamente ridotto.



JJ

Salina : controllo senza artrite indotta; mBSA: artrite indotta da BSA, non trattati; non correlato: artrite indotta con BSA, trattati con anticorpo scFv non correlato; TS-A12/22: artrite indotta con BSA, trattato con l'anticorpo dell'invenzione.

**Figura 7. Analisi in immunofluorescenza della membrana sinoviale di ratti con artrite indotta da antigene.**

Sezioni istologiche di articolazione di ratti trattati con inoculo intraarticolare di soluzione fisiologica (A), BSA (B), BSA con TS-A12/22 (C) e BSA con anticorpo non correlato (D) sono state esaminate in immunofluorescenza per la presenza dei componenti complementari C3 e C9, come descritto nell'esempio 10. Si evidenzia che il trattamento con TS-A12/22 non influenza la deposizione di C3 ma riduce sensibilmente quella di C9, confermando l'inibizione di C5.

**DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

Oggetto principale della presente invenzione è un anticorpo di origine umana avente specificità per il componente C5 del sistema complementare e caratterizzato dal fatto di inibire la scissione della catena C5 alfa, anche denominata C5 attivato, nei frammenti C5a e C5b.

Tale scissione avviene per effetto di attivazione complementare che avviene secondo meccanismi noti.

In seguito all'attivazione complementare si forma una C5 convertasi che scinde la catena alfa del fattore C5 generando un frammento di circa 70 amminoacidi (aa), noto come C5a, ed un frammento C-terminale di 925 aa, C5b. I prodotti di attivazione del C5, C5a e C5b, sono



biologicamente attivi. In particolare, il C5a ha attività chemiotattica per leucociti polimorfonucleati e per monociti mentre il frammento C5b contribuisce alla formazione del complesso terminale complementare (TCC).

Tale anticorpo è preferibilmente ricombinante.

L'anticorpo secondo l'invenzione è di origine umana, cioè è derivato interamente da un repertorio di anticorpi ottenuto da linfociti umani. Tali anticorpi hanno sia il framework che le regioni di complementarietà all'antigene (CDR) di origine umana, al contrario degli anticorpi umanizzati dove invece solo il framework è di origine umana mentre le CDR sono di origine murina.

Per anticorpo ricombinante, è inteso un anticorpo costituito da almeno una regione variabile derivata dalla catena pesante o leggera di una immunoglobulina e prodotto secondo le tecniche di ingegneria genetica a partire dalle sequenze nucleotidiche codificanti per le regioni caratterizzanti dell'anticorpo, in un organismo ospite, costituito da batteri, lieviti, oppure cellule di eucarioti superiori (vegetale o animale). La tecnica di produzione mediante ingegneria genetica permette sia la produzione di anticorpi del tutto umani, che la scelta di un formato diverso da quello degli Ab naturali. Al contrario, gli anticorpi prodotti secondo la classica tecnologia degli ibridomi, descritta da Milstein et al. possono essere solo murini o di ratto ed hanno il tipico formato degli anticorpi a Y con quattro catene, uguali due a due, di cui una pesante ed una leggera ognuna composta da una parte costante e da una variabile, come descritto in Rathburn, G. et al. (1989) in Immunoglobulin



genes, Academic Press, New York.

Secondo una realizzazione preferita, l'anticorpo ricombinante anti-C5 oggetto dell'invenzione è caratterizzato dal fatto di riconoscere un epitopo sulla catena alfa del componente C5, che comprende la regione di taglio della C5 convertasi. La specificità di legame dell'anticorpo dell'invenzione per l'epitopo comprendente il sito di taglio della C5 convertasi, che sul C5 umano è situato tra la glicina 733 ed arginina 734 secondo la numerazione utilizzata dalla banca dati SwissProt per il C5 umano (seqID P01031) può essere verificata *in vitro*, ad esempio, mediante un saggio ELISA di competizione su C5 con un peptide sintetico, ad esempio il peptide KDMQLGR<sup>↓</sup> LHMKTLLPVSK (dove la freccia indica il taglio proteolitico), corrispondente alla regione 727-744 della proteina matura umana. Secondo questo aspetto, l'anticorpo è caratterizzato preferibilmente dal fatto di riconoscere un polipeptide comprendente una regione avente almeno l'80% di omologia con il peptide KDMQLGR<sup>↓</sup> LHMKTLLPVSK, corrispondente alla seq IDN15) e preferibilmente dal fatto di riconoscere un epitopo di almeno 6-10 aminoacidi costituito da 1-5 aminoacidi a monte e da 1-5 aminoacidi a valle del legame peptidico scisso dall'enzima C5 convertasi, preferibilmente il l'epitopo LGRLHM.

La regione nell'intorno del sito di taglio è altamente conservata in diverse specie di mammifero, pertanto l'anticorpo secondo l'invenzione riconosce con efficienza di legame molto simile il fattore C5 di ratto, di topo, di coniglio etc, ed in ciascuna di queste specie ha lo stesso effetto di bloccare la conversione del C5 attivato ai suoi frammenti attivi

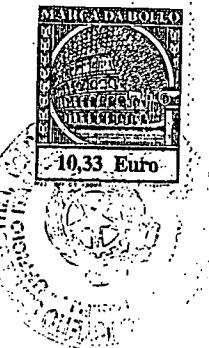


C5a+C5b.

L'anticorpo ricombinante dell'invenzione è preferibilmente in formato a catena singola (scFv), corrispondente alla seq IDN6, e comprende la regione variabile della catena leggera unita covalentemente con la regione variabile della catena pesante tramite o meno una sequenza amminoacidica denominata linker. Per scFv è inteso il formato dell'anticorpo a catena polipeptidica unica, composta dalla regione variabile della catena leggera unita tramite o meno un linker sintetico alla regione variabile della catena pesante. Linker aventi sequenze amminoacidiche non naturali (sintetiche) sono noti nell'arte e sono descritti ad esempio in (1999): Combinatorial Chemistry and Technology: Principles, Methods, and application, Marcel Dekker Inc, NY USA. Il linker sintetico è preferibilmente la sequenza nucleotidica IDN 13 del listato sequenze.

Nell'anticorpo scFv dell'invenzione, le catene VH e VL sono preferibilmente nell'ordine VL-VH, andando in senso da N a C-terminale della catena polipeptidica. Questo formato, in cui l'N-terminale è costituito dalla catena VL, conferisce maggior idrofilicità sia all'intera proteina espressa singolarmente che alle proteine di fusione comprendenti entrambe le regioni VL e VH ed inoltre consente di inserire a monte o a valle sequenze peptidiche denominate "tag" o "flag", che non alterano le caratteristiche di legame, ma che sono utilizzate ad esempio per facilitare la rivelazione immunologica dell'anticorpo, oppure la sua produzione o purificazione.

Ai fini della presente invenzione, l'anticorpo può essere anche nel



formato (N-C terminale) VH-VL, oppure può comprendere una sola delle due catene variabili, preferibilmente la catena VH, corrispondente alla seq ID n° 4, anche in associazione con catene VL diverse, anche indipendentemente dalla loro specificità, come selezionabili ad esempio mediante interazione con "collezioni di repertori molecolari". Nell'anticorpo dell'invenzione la catena VL ha preferibilmente sequenza corrispondente alla seq IDN2 che può essere legata covalentemente o meno con la catena VH.

Nell'anticorpo scFv preferibilmente almeno la catena VH ha specificità anti-C5 sopra indicata e corrisponde preferibilmente alla seq ID n°4 del listato sequenze o sue varianti isotipiche o mutazioni conservative. In accordo con questo aspetto, quindi, l'invenzione si estende a tutti i polipeptidi comprendenti una regione avente almeno il 95% di omologia con la sequenza amminoacidica della regione VH, preferibilmente VH3 corrispondente alla sequenza IDN4. Una realizzazione particolarmente preferita di tale scFv è costituita dall'anticorpo avente sequenza amminoacidica corrispondente alla seq IDn°6, corrispondente alle sequenze 4 e 2 unite da un linker peptidico di sequenza corrispondente alla seq IDN 14. In accordo con la sua realizzazione preferita, l'anticorpo scFv corrispondente alla seq Idn°6, ha una costante all'equilibrio verso l'antigene superiore a  $1 \times 10^7$ , preferibilmente superiore a  $1 \times 10^8$ .

Rientrano comunque nella portata della presente invenzione le sequenze amminoacidiche ottenute per mutazioni delle sequenze riportate nell'allegato sequenze, purchè tali mutazioni non alterino la specificità descritta anti-C5 dell'anticorpo. La mutazione può essere



"conservativa", quando operata in base a caratteristiche strutturali o chimiche dell'amminoacido simili, ad esempio in base alla somiglianza in polarità, carica, solubilità, idrofobicità, idrofilicità oppure in base alla natura anfipatica dei residui amminoacidici coinvolti. Ad esempio i gruppi di amminoacidi che condividono caratteristiche di polarità simili sono costituiti dagli aa non-polari (idrofobici) che includono alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina; da amminoacidi non-polari o neutri che includono: glicina, serina, treonina, cisteina, tirosina, asparagina e glutammmina; amminoacidi carichi positivamente (basici) che includono: arginina, lisina e istidina; e dal gruppo degli amminoacidi carichi negativamente (acidi) che comprende: acido aspartico ed acido glutammico.

Le mutazioni possono essere anche effettuata a caso, ad esempio può essere generata mediante DNA polimerasi note "error prone".

Pertanto secondo un suo ulteriore aspetto l'invenzione comprende gli anticorpi ricombinanti generati per mutagenesi delle sequenze nucleotidiche seq IDN3 e 5 corrispondenti alle sequenze codificanti per la regione VH e per l'anticorpo nel formato scFv. In accordo con questo aspetto l'invenzione comprende quindi un procedimento per generare anticorpi aventi specificità per il componente C5 del complemento attivato, dotati o meno della capacità di bloccare la scissione del C5 alfa nei suoi componenti biologicamente attivi, che comprende essenzialmente la mutagenesi casuale o mirata delle sequenze nucleotidiche codificanti per la seq IDN 4 e N6, preferibilmente quindi che comprende la mutagenesi delle sequenze nucleotidiche 3 e 5.



All'interno del formato preferito dell'anticorpo, costituito delle regioni variabili della catena leggera o pesante degli anticorpi unite in singola catena scFv mediante un linker proteico, ancor più preferibilmente la catena leggera è la catena lambda, ed in particolare la catena V $\lambda$ 3/V2-14, oppure la catena kappa, preferibilmente la V $\kappa$ 4/DPK24. La catena pesante è la catena VH3, in particolare VH3/V-48, come definite in banca dati al sito: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imtdoc/restricted/ok.html> (Vbase index). Secondo questo aspetto l'invenzione comprende tutti gli anticorpi derivati mediante mutagenesi della sequenza nucleotidica codificante per la catena VH, o per il scFv dell'invenzione caratterizzati dal fatto di mantenere la specificità per il componente C5 del sistema complementare e caratterizzati dal fatto di inibire la scissione della catena C5 alfa, anche denominata C5 attivato, nei frammenti C5a e C5b.

E' noto al tecnico del ramo che in un anticorpo, la specificità di legame all'antigene, è determinata prevalentemente dalle regioni CDR (Complementarity Determining Region), che sono definite come le regioni ipervariabili dell'anticorpo. Esistono tre regioni ipervariabili per ogni regione variabile sia della catena pesante che di quella leggera: i precisi limiti all'interno delle regioni meno variabili o "framework", entro cui i CDR sono compresi tuttavia, non sono unanimemente accettati. Esistono infatti due classificazioni diverse. La prima parla di variabilità di sequenza (Kabat et al.) e la seconda di variabilità strutturale (Chothia et al.). Poiché però la specificità di legame all'antigene è principalmente dovuta alle regioni CDR, è stato possibile, tramite le tecniche del DNA



ricombinante, costruire anticorpi chimerizzati che sfruttano la specificità di legame dei CDR murini, montati sulle regioni framework degli anticorpi umani. La specificità di tali anticorpi risulta essere quella del monoclonale murino. Pertanto rientrano nella portata della realizzazione particolare della presente invenzione, costituita dalle sequenze amminoacidiche e nucleotidiche delle 3 regioni CDR della parte variabile della catena leggera e delle 3 regioni CDR della parte variabile della catena pesante (seq ID 7,8, 9 rispettivamente), tutti gli anticorpi generati mediante "grafting" delle regioni CDR o di almeno il terzo CDR, corrispondente alle seq ID N9 in altre strutture portanti anticorpali o anticorpi mimetiche, quali ad es. i "minibodies" i CDR dell'invenzione sono tridimensionalmente posizionati in modo da mantenere la specificità di legame per il C5.

In buona sostanza, in accordo con questo aspetto, la presente invenzione comprende qualsiasi anticorpo umano ricombinante in grado di riconoscere l'epitopo comprendente la regione di taglio della C5 convertasi sul fattore C5 attivato, preferibilmente caratterizzato dal fatto di comprendere quali regioni CDR almeno tre delle sequenze amminoacidiche identificate nell'allegato sequenze come: seq. ID n° 7, seq. ID n° 8, seq. ID n° 9 o loro mutazioni conservative.

L'invenzione comprende inoltre le proteine chimeriche comprendenti almeno uno tra i polipeptidi corrispondenti alle seqID n° 2, 4, o 6 o loro mutazioni conservative o non conservative aventi almeno il 95 % di omologia tali sequenze, ottenibili secondo le tecniche dell'ingegneria genetica. L'invenzione quindi si estende ai polipeptidi comprendenti



A handwritten signature of the law firm Notarbartolo &amp; Gervasi S.p.A.

sequenze amminoacidiche specifiche dell'anticorpo definite come seq IDN 2,4,6, 8, 10, 12, anche quando preparate in formato diverso da quello canonico o naturale degli anticorpi, ed ovviamente si estende alle sequenze amminoacidiche del listato Sequenze anche quando comprendenti peptidi addizionali posti all'estremità C o N-terminale, quali ad esempio le sequenze "tag" o "flag" di utilità nella purificazione o nel riconoscimento immunologico dell'anticorpo ricombinante nei suoi diversi formati.

Un tipo particolarmente preferito di sequenza "tag" è la coda poliistidinica, codificata dal vettore di espressione utilizzato nella presente invenzione, ed espressa al C-terminale della sequenza IDN6 al fine di facilitare la purificazione per affinità su colonna di nichel, oppure la sequenza SV5 di SIV che viene aggiunta per facilitare il riconoscimento immunologico.

Costituiscono un ulteriore oggetto dell'invenzione tutte le sequenze nucleotidiche ottenute per degenerazione del codice genetico e caratterizzate dal fatto di codificare per l'anticorpo scFv di sequenza Idn°6, oppure per la catena pesante VH corrispondente alla seq.IDN4, per la catena leggera corrispondente alla seq.IDN2 e le sequenze nucleotidiche codificanti per polipeptidi aventi almeno il 95% di omologia con la seq IDN6, la seq IDN4, la seq IDN 2, preferibilmente con la seq IDN 4, o codificanti per le loro varianti conservative. Costituiscono quindi realizzazione particolarmente preferite delle sequenze nucleotidiche dell'invenzione, le sequenze nucleotidiche identificate con seqID N 1, 3, 5 del listato sequenze o sequenze nucleotidiche comprendenti tali



sequenze.

Sono inoltre comprese nella presente invenzione tutte le sequenze nucleotidiche ottenute mediante "parsimonious mutagenesis" (Schier, R., et al., 1996, *Gene* 169:147) oppure mediante altri metodi di mutagenesi random o mirata dalle sequenze nucleotidiche dell'invenzione, in particolare delle seq IDN 1, 3, 5, (Marks, J. D., et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:16007) effettuate allo scopo di migliorare alcune delle proprietà degli anticorpi, ad esempio l'affinità, mantenendo invece la specificità di legame per il sito di taglio del C5. Sono inoltre compresi nella presente invenzione tutti gli anticorpi in formato scFv generati mantenendo costante la sequenza codificante per la regione VH corrispondente alla seq. IDN 3 e sostituendo mediante "chain shuffling" la regione codificante per la regione VL dell'anticorpo TS-A12/22, corrispondente alla sequenza IDN 1, ad esempio utilizzando collezioni ("libraries") di regioni VL umane.

Le sequenze nucleotidiche oggetto della presente invenzione sono clonate in opportuni vettori per la loro amplificazione, per ulteriore mutagenesi o modificazione o per la loro espressione. I vettori comprendenti le sequenze nucleotidiche 1, 3, 5, 7, 9, 11 rappresentano quindi un ulteriore oggetto dell'invenzione, e sono utilizzati preferibilmente per la preparazione degli anticorpi ricombinanti o delle proteine chimeriche nell'ospite opportuno e secondo metodi noti.

Secondo una realizzazione preferita, gli anticorpi ricombinanti sono clonati in vettori di espressione preferibilmente procariotici: particolarmente preferiti sono i vettori per l'espressione in *E.coli*, anche



se possono essere utilizzati anche altri ospiti procariotici, quali *B. subtilis*, *P. pastoris*, *K. Lactis*, oppure cellule eucariotiche vegetali o animali. Il vettore di espressione che ospita tali sequenze nucleotidiche è ottimizzato per l'espressione in ciascuno di questi ospiti, mediante l'inserimento delle regioni di regolazione, promotori, terminatori o attivatori della trascrizione, o origini di replicazione opportuni. Una delle realizzazioni particolarmente preferite dei vettori secondo l'invenzione è costituita da vettori per l'espressione periplasmatica in *E. coli*, in particolare il vettore pDAN5 (Sblattero, D. e Bradbury A., 2000, *Nat. Biotechnol.* 18:75).

L'anticorpo o le proteine chimeriche aventi la specificità descritta nella presente l'invenzione inibiscono la conversione di C5 nei suoi prodotti biologicamente attivi. In particolare bloccando la formazione di C5b, bloccano la formazione del complesso C terminale (TCC) che porta alla formazione del MAC (Membrane Attack Complex) in grado di determinare una lisi cellulare massiva ed un danno tissutale notevole. Inoltre inibendo la formazione di C5a inibiscono l'attività chemiotattica del C5a nei confronti di leucociti polimorfonucleati e monociti che, dopo stimolazione, producono sia citochine quali ad es. IL-1, IL-6, IL-8, che altri importanti mediatori della risposta infiammatoria quali elastasi seriniche, perossidasi, etc.

Sia l'attività chemiotattica di C5a che quella citolitica del MAC alla cui formazione partecipa il C5b, sono considerate le cause principali del danno tissutale indotto in numerose patologie infiammatorie. Elevati livelli del frammento C5a e del TCC sono stati riscontrati ad esempio nel

88

liquido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide o nel fluido cerebrospinale di pazienti con varie patologie del sistema nervoso centrale.

Un ulteriore aspetto dell'invenzione, pertanto, è relativo all'uso terapeutico degli anticorpi ricombinanti anti-C5 secondo l'invenzione, preferibilmente umani, in particolare di quelli che inibiscono la conversione del componente C5 in C5a e C5b, in uno dei formati descritti nell'invenzione: scFv, regioni VH e/o VL, proteine chimeriche o singole regioni variabili e loro mutazioni conservative, varianti isotipiche etc. e all'uso terapeutico delle loro realizzazioni preferite costituite dalle sequenze amminoacidiche seqIDN2, 4, 6 del listato sequenze.

Gli anticorpi secondo l'invenzione bloccano la conversione del C5 ad opera della C5 convertasi. Poiché tale enzima può essere attivato sia attraverso la via classica, iniziata dal componente C1q del complemento ad opera dei complessi antigene-anticorpo o da aggregati di IgG o IgM, che attraverso la via di attivazione alternativa, iniziata dalla presenza di sostanze naturali, quali lectine, pareti cellulari batteriche o di lievito, da alcuni veleni di serpente o da fattori nefritici, è stato verificato se gli anticorpi o le proteine dell'invenzione bloccassero solo l'una o l'altra via di attivazione del complemento. Da esperimenti *in vitro* effettuati mediante il saggio emolitico su eritrociti di montone (SRBC: Sheep Red Blood Cells) oppure su eritrociti di coniglio (RBC), gli anticorpi e le proteine secondo la presente invenzione inibiscono sia la via classica che la via alternativa di attivazione del complemento.

Nell'uso degli anticorpi o delle proteine aventi specificità per il



componente C5 secondo la presente invenzione, il vantaggio è che i componenti iniziali del complemento rimangono comunque disponibili per l'opsonizzazione e per l'eliminazione degli immunocomplessi. Questo approccio terapeutico risulta vantaggioso anche rispetto ad un eventuale blocco a livello del componente C3, preliminare all'entrata in gioco del C5 e che porterebbe ad un totale blocco della cascata del complemento e delle sue funzioni opsonizzanti e di eliminazione degli immunocomplessi.

Pertanto, in una sua realizzazione particolarmente preferita, gli anticorpi o le proteine dell'invenzione, in una delle realizzazioni descritte o in quelle ovviamente derivabili, sono utilizzati per la preparazione di farmaci per il trattamento delle patologie dovute o accompagnate ad una iperattivazione del sistema del complemento. L'invenzione si estende all'uso degli anticorpi e delle proteine dell'invenzione e delle sequenze nucleotidiche per esse codificanti in campo diagnostico, nell'ambito della diagnosi di disordini caratterizzati o accompagnati da una attivazione incontrollata del complemento, in particolare del componente C5 o dei suoi frammenti biologicamente attivi.

Più preferibilmente, i polipeptidi e gli anticorpi dell'invenzione sono utilizzati per il trattamento o la prevenzione di patologie dovute o accompagnate dall'azione citotossica e proinfiammatoria del complesso C terminale (Terminal C Complex TCC), dove in particolare tali patologie comprendono le infiammazioni croniche, in particolare l'artrite reumatoide, la glomerulonefrite, la sclerosi multipla, le neuropatie periferiche demielinizzanti, l'aterosclerosi, o alcune patologie a base



autoimmune.

Prove sperimentali hanno inoltre dimostrato che i polipeptidi e gli anticorpi antiC5 dell'invenzione sono di utilità terapeutica sia nel trattamento che nella prevenzione di patologie infiammatorie acute, indotte o accompagnate dall'attivazione massiva del componente C5, che agisce sia attraverso l'attività chemiotattica del frammento C5a, che attraverso l'attività del TCC iniziata dal frammento C5b. Le patologie acute sono costituite ad esempio da sepsi batterica, da danni tissutali, quali ad es. danni del miocardio, del tessuto nervoso centrale, danni da trapianto, provocati da ischemia e riparazione in seguito ad ischemia.

In un suo ulteriore aspetto l'invenzione riguarda inoltre le sequenze nucleotidiche codificanti per gli anticorpi o le proteine secondo l'invenzione, o dei vettori che le contengono, per uso terapeutico. Preferibilmente esse sono utilizzate nella terapia genica somatica di patologie indotte o accompagnate dall'attivazione massiva del componente C5, da una attivazione incontrollata del sistema del complemento, da un eccesso di produzione dei frammenti C5a e C5b, da un eccesso di produzione dei componenti da C5 a C9 del complemento, come nell'artrite reumatoide o in alcune patologie a base autoimmune. Poiché un livello di attivazione del sistema del complemento superiore alla norma, così come un livello di conversione del componente C5 attivato nei suoi frammenti biologicamente attivi, non sono facilmente quantificabili perché legati alla variabilità individuale ed allo stato di salute generale, tali livelli sono sinteticamente definiti come livelli che sono in grado di provocare uno stato patologico acuto o



cronico.

Rientra nell'oggetto della presente invenzione ed è ottenibile secondo metodi noti al tecnico del ramo, costituendone un'applicazione utile nello studio delle malattie genetiche caratterizzate da insufficiente produzione di C5a e C5b o da iperattivazione dei componenti del complemento da C5 a C9, la produzione *in vivo* degli anticorpi secondo l'invenzione in animali transgenici, ottenuta modificando geneticamente mammiferi non umani con almeno una delle sequenze nucleotidiche descritte nella presente invenzione.

Gli anticorpi e le proteine dell'invenzione e le sequenze nucleotidiche per essi codificanti, sono preparabili per uso terapeutico sotto forma di composizioni farmaceutiche in combinazione con opportuni eccipienti e/o diluenti adatti alla somministrazione per via preferibilmente parenterale.

Gli anticorpi dell'invenzione permettono inoltre la preparazione di kit a scopo diagnostico, terapeutico o di ricerca, dove tali kit comprendono almeno uno degli anticorpi o delle catene variabili descritte nell'invenzione e corrispondenti alle sequenze IDN 2,4,6, o loro omologhi varianti o frammenti derivati per la diagnosi o la prognosi di patologie caratterizzate da un iperattivazione del componente C5. Le sequenze nucleotidiche dell'invenzione corrispondenti alle sequenze IDN 1,3,5 e loro omologhi, preferibilmente di utilizzo per la preparazione di kit per la trasformazione di cellule eucariotiche.

Una realizzazione del kit secondo la presente invenzione, di utilizzo ad esempio per la selezione di composti che interferiscono con la scissione



della catena alfa del componente C5 del complemento nei suoi frammenti biologicamente attivi, è costituito dai polipeptidi dell'invenzione, preferibilmente dalla catena VH (seqIDN4) oppure dalla catena scFv (seq IDN6) e da almeno uno dei seguenti polipeptidi: componente C5 del complemento o dalla sua catena alfa, oppure dal peptide che comprende il sito di taglio della C5 convertasi, preferibilmente corrispondente alla sequenza IDN15. I composti possono essere identificati ad esempio mediante un saggio competitivo che vede l'inibizione del legame peptide-anticorpo.

Gli anticorpi ed i polipeptidi secondo l'invenzione, indipendentemente dal fatto di derivare da una libreria di anticorpi umani, sono caratterizzati dalla capacità di riconoscere il componente C5 del complemento a livello di un epitopo presente sulla catena alfa del componente C5, che comprende la regione di taglio della C5 convertasi. La specificità di legame dell'anticorpo dell'invenzione per l'epitopo comprendente il sito di taglio della C5 convertasi, è situato per il C5 umano tra la glicina 733 ed arginina 734 secondo la numerazione utilizzata dalla banca dati SwissProt (seqID P01031). Tale epitopo potrà essere diversamente posizionato sul C5 di specie di mammifero diverse dall'uomo, come per il ratto, il topo, il coniglio, ma si considererà comunque avente la stessa specificità se avrà come effetto di bloccare la conversione del rispettivo C5 in C5a e C5b.

Pertanto, secondo un ulteriore aspetto, l'invenzione riguarda l'uso degli anticorpi anti-C5 dell'invenzione, per la messa a punto di modelli sperimentali animali delle patologie indotte o accompagnate da una



A handwritten signature in black ink, likely belonging to the Notary or the company, is located in the bottom right corner of the page.

iperattivazione del sistema del complemento in particolare del C5.

In accordo con un ulteriore aspetto l'invenzione riguarda il peptide del fattore C5 del complemento appartenente a specie mammifere, e preferibilmente umano, che comprende il sito di taglio della C5 convertasi. Questo peptide è preferibilmente il peptide comprendente la regione corrispondente alla regione 731-740 della proteina matura umana. Ancor più preferibilmente il peptide ha sequenza KDMQLGR<sup>1</sup>LHMKTLLPVSK, corrispondente alla regione 727-744 della proteina umana. I peptidi in accordo con quest'ultimo aspetto dell'invenzione sono utilizzati nella preparazione di medicamenti, ad esempio vaccini, o come immunogeni per preparare antisieri, per la prevenzione ed il trattamento di stati patologici legati ad una attivazione incontrollata del componente C5 del complemento quali l'artrite reumatoide o alcune patologie a base autoimmune.

In accordo con questo ulteriore aspetto l'invenzione comprende inoltre l'uso del peptide comprendente la regione corrispondente alla regione 731-740 della proteina matura umana, o un peptide avente almeno l'80% di omologia con tale regione, ivi comprese le regioni corrispondenti del componente C5 di mammiferi non umani, e ancor più preferibilmente l'uso del peptide avente sequenza KDMQLGR<sup>1</sup>LHMKTLLPVSK (derivato dalla proteina umana) o di un peptide avente almeno l'80% di omologia con tale peptide, insieme o in alternativa con gli anticorpi ricombinanti anti-C5, in particolare quelli comprendenti la regione variabile della catena pesante VH corrispondente alla sequenza Idn° 4 o l'anticorpo scFV, corrispondente



alla sequenza ID n° 6, per la selezione di farmaci e di anticorpi anche ricombinanti in grado di inibire la conversione del fattore C5 attivato nei suoi frammenti biologicamente attivi C5a e C5b.



**PARTE Sperimentale****Materiali.**

*Libreria anticorpale.* La libreria di anticorpi utilizzata, avente una complessità di  $7 \times 10^9$ , fu derivata da linfociti umani periferici non immuni (naive). La sua costruzione è descritta in Sheets, M. D., et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:6157.

*Batteri.* Per l'amplificazione fagica fu utilizzato il ceppo di *E.coli* DH5aF' (*F'λendA1 hsdR17 (rK- mK<sup>+</sup>) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal<sup>r</sup>) relA1 D (lacZYA-argF) U169 deoR* (*F80d/lacD(lacZ)M15*)). Per la preparazione dei frammenti scFv, fu utilizzato il ceppo di *E. coli* HB2151 (K12, *ara*  $\Delta$ (*lac-pro*), *thi/F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacZΔM15*).

*Proteine purificate.* I componenti da C4 a C9 purificati, furono acquistati da Quidel (San Diego, CA) ed il componente C5a umano, ricombinante fu acquistato da Sigma-Aldrich S.r.l.(Milan, Italy). Le subunità C5 $\alpha$  e  $\beta$  furono ottenute incubando 50  $\mu$ g di C5 diluito in 0.55 M TRIS-HCl pH 8.1 contenente DTT (0.02 M) per 30 min a temperatura ambiente (RT), seguito da trattamento con iodoacetamide (0.12 M) per 1 ora a R.T. Le due catene alfa e beta furono purificate mediante gel filtrazione su Superose 12 (Pharmacia Biotech, Milan, Italy) in Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) e valutate per la purezza su SDS-PAGE in condizioni non riducenti.

*Sieri.* Un siero carente della componente C5 del complemento (C5D) fu ottenuto da un paziente con infezione da meningococco. In questo siero i livelli di C5 erano a livelli non rivelabili e mancava l'attività emolitica, ricostituibile mediante aggiunta esogena di fattore C5. Siero umano



ottenuto da donatori di sangue fu utilizzato come sorgente di fattore C5.

*Preparazione dell'intermedio EAC1-3b per il saggio emolitico.*

Eritrociti di pecora (SBRC: Sheep red blood cells) furono sensibilizzati con quantità subagglutinanti di IgM di coniglio (EA). L'intermedio EAC1-3b per la reazione di lisi eritrocitaria fu preparato incubando gli eritrociti sensibilizzati con anticorpi (EA) con una diluizione 1/10 del siero depletato di C5 (C5D) in tampone salino contenente glucosio e Veronal (GVBS) per 70' a 37°C, seguito dall'aggiunta di suramina (Bayer, FRG) per bloccare la reazione di degradazione come descritto da Harrison, R. A., and P. J. Lachmann (Harrison, R. A., and P. J. Lachmann. 1986. Complement technology. In *Handbook of Experimental Immunology*. D. M. Weir, L. A. Herzemberg, C. Blackwell, and A. Herzemberg Leonore, eds. Blackwell Scientific Publ, London.

*Antisieri.* Furono utilizzati due anticorpi monoclonali anti C5a (Oppermann et al. Complement Inflamm., 1991, 8:13, ed un antisiero anti-C5 di capra (Quidel, San Diego, California U.S.A.).

#### **Esempio 1. Amplificazione e selezione della libreria fagica.**

I fagi furono ottenuti ed amplificati come descritto in Marks, J. D. et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581. La selezione fu effettuata in "immunotubi" (Nunc, Mascia Brunelli, MI, IT) rivestiti con la proteina C5 purificata. Il rivestimento (coating) degli "immunotubi" fu ottenuto mediante incubazione con una soluzione di C5 (10 µg/ml in PBS) overnight a 4°C. I fagi furono diluiti con PBS contenente 2% non-fat dry milk (MPBS) ed incubati negli immunotubi per 60' a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, gli immunotubi furono lavati 20 volte con PBS contenente



*AB*

0.1% Tween 20 (PBST) e 20 volte con PBS. I fagi legati agli immunotubi furono eluiti con 1 ml di una coltura batterica di *E. coli* ad una densità di 0.5 OD<sub>600</sub> per 30' a 37° C. Quindi fu aggiunta ampicillina (75 µg/ml), il fago helper, la kanamicina (25 µg/ml) e la coltura fu quindi cresciuta overnight.

Dopo il secondo ciclo di selezione su immunotubi rivestiti con C5, le cellule di *E. coli* eluite furono amplificate per l'estrazione del DNA fagemidico con metodi noti nell'arte. Il DNA estratto fu utilizzato come template per l'amplificazione mediante PCR delle regioni VH e VL, separatamente, e successivo assemblaggio e clonaggio nel vettore pDAN5 (Sblattero, D., e Bradbury A., 2000, *Nat. Biotechnol.* 18:75), un vettore fagemidico contenente le regioni lox, His<sub>6</sub> e la regione di riconoscimento della proteina p27 SV5 del virus SIV, caratterizzato dal fatto che le regioni VH e VL vengono inserite nel vettore e quindi espresse, nell'ordine VL-VH, con al catena leggera all'N-terminale. Dopo trasformazione con il fagemide, le cellule di *E. coli* furono incubate con il fago helper e le particelle fagiche utilizzate per il terzo ciclo di selezione.

Dopo eluizione, i cloni furono analizzati per la capacità di legare il C5 secondo quanto descritto nell'Esempio 2.

**Esempio 2. Isolamento di particelle fagiche con specificità di legame per l'antigene C5.**

Le particelle fagiche ottenute dopo tre cicli di "panning" su C5 in immunotubi (come descritto nell'esempio 1), furono usate per infettare cellule di *E. coli*, cresciute su terreno solido. Singole colonie batteriche furono trasferite in piastra da 96-pozzetti ed i fagi risultanti saggianti



ulteriormente mediante ELISA per la capacità di legare il C5. L'antigene C5 in concentrazione di 10 µg/ml in 0.1 M tampone bicarbonato pH 9.6 fu fatto aderire alle piastre mediante incubazione overnight a 4°C. Dopo saturazione delle piastre con MPBS (PBS contenente non-fat dry milk 2%), 50 µl della sospensione fagica furono diluiti con uno stesso volume di MPBS e fu quindi aggiunto un anticorpo monoclonale anti-pIII (proteina di M13) coniugato con HRP (Pharmacia Biotech). La positività al legame fu rivelata con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina diclorato (Sigma-Aldrich) come substrato e l'assorbimento a 450 nm letto mediante spettrofotometro.

I cloni positivi al saggio ELISA furono ulteriormente selezionati in base alla diversità dei frammenti codificanti per le regioni V. Le regioni V furono amplificate utilizzando i primers specifici descritti in Marks et al. (op. cit), digerite con BstNI e separate elettroforeticamente su un gel di agarosio al 2%. Furono isolati 12 cloni risultanti diversi tra loro in base al pattern elettroforetico.

**Esempio 3. Preparazione degli anticorpi a catena singola ScFv solubili.**

Le particelle fagiche dei cloni ottenuti come descritto nell'Esempio 2 furono utilizzate per infettare il ceppo di E.coli HB2151, al fine di ottenere l'espressione dei frammenti scFv in forma solubile. I batteri furono cresciuti fino a O.D. 0.5 in terreno 2XYT contenente ampicillina, indotti con isopropil-β-tiogalattopiranoside e cresciuti per ulteriori 5 ore. La frazione periplasmica contenente gli anticorpi scFv fu preparata mediante incubazione con il reagente B-PER (Pierce, Celbio, MI, IT) per



20' a RT, seguito da centrifugazione per 15' a 27000xg. Il sopranatante fu dializzato contro PBS e gli anticorpi a catena singola, contenenti la coda polistidinica al C-terminale, purificati mediante chromatografia di affinità su resina di nichel Ni-NTA (Qiagen, MI, IT).

La capacità di legame al fattore C5 degli anticorpi a catena singola purificati, fu verificata mediante un saggio ELISA su fase solida analogamente a quanto fatto per le particelle fagiche, eccetto che come anticorpo di rivelazione fu utilizzato un anticorpo monoclonale contro il peptide SV5-tag, espresso al C-terminale degli anticorpi a catena singola anziché l'anticorpo anti-pIII di M13.

Il protocollo del saggio ELISA fu il seguente: i pozzetti di una micropiastra 96-pozzetti furono rivestiti con l'antigene (C5 purificato, 250 ng), mediante incubazione per una notte in tampone 0.1 M bicarbonato di sodio, pH 9.6 a 4°C e quindi lavati con PBS 0.1% Tween 20 (PBST); i siti di legame residui furono bloccati con PBS contenente 1% BSA per 1 h a 37°C. Gli estratti batterici o l'anticorpo a catena singola scFv purificato (1 $\mu$ g/ml) furono quindi incubati e rivelati con l'anticorpo anti-SV5tag (diluito 1/1000) e quindi con un anticorpo di capra anti-IgG di topo (diluito 1/1000) con incubazioni di 1 ora a 37°C. La reazione enzimatica fu sviluppata con p-nitrofenilfosfato (Sigma Aldrich; 1 mg/ml) come substrato in tampone glicina 0.1M pH 10.4 contenente 1mM MgCl<sub>2</sub> e 1mM ZnCl<sub>2</sub> e l'assorbanza letta a 405 nm con ELISA reader Titertek multiskan.

Tutti gli anticorpi scFv purificati risultarono in grado di legare il fattore C5 mediante il saggio ELISA descritto.

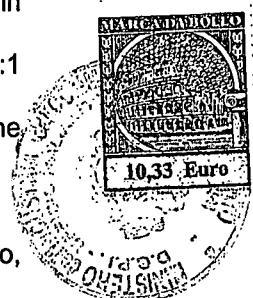


**Esempio 4. Determinazione dell'affinità di legame dell'anticorpo scFv TSA-12 al fattore C5 mediante Surface Plasmon Resonance (SPR).**

La misurazione dell'affinità dell'anticorpo TSA-12, purificato mediante FPLC su Superdex 75 (Pharmacia), per il fattore C5 fu valutata mediante BIACORE 2000. Il microchip (CM5, Biacore) fu preparato coniugando direttamente con ammine l'antigene C5 (20 µg/ml in 10 mM sodio acetato pH 4.5). Il livello di immobilizzazione finale risultò essere di circa 1000 RU (Resonance Units). L'associazione e la dissociazione delle molecole di anticorpo dal bio-chip furono misurate utilizzando un sistema ottico di rivelazione (Surface Plasmon Resonance).

L'analisi fu effettuata a 25°C, ad un flusso di 15 µl/min, ed utilizzando 4 diverse concentrazioni di scFv nell'intervallo compreso tra 100-300 nM in PBS, 0.005% P20 (Biacore). Le curve di legame furono interpolate 1:1 secondo il modello di Langmuir, utilizzando il software di legame BIAevaluation (ver. 3.5) con correzione per il trasferimento di massa.

Le misurazioni effettuate sulla costante di dissociazione all'equilibrio, sono riportate in tabella 1.



**Tabella 1. Velocità di associazione e dissociazione del scFv TS-A12 su C5 purificato ed immobilizzato su chip.**

clone	$k_{on} (10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$k_{off} (10^{-3} \text{ s}^{-1})$	$K_D (10^{-9} \text{ M})^a$
TSA-12	1.3	0.026	200

<sup>a</sup> La costante di equilibrio fu calcolata come  $K_D = k_{on} / k_{off}$

Come è mostrato in tabella 1 la KD calcolata per l'anticorpo TS-A12 risulta essere di  $2 \times 10^{-7}$  M (affinità sub-micromolari), in accordo con quanto previsto per gli anticorpi derivati da collezioni (libraries) di anticorpi non immuni.

**Esempio 5. Incremento dell'affinità dell'anticorpo TS-A12 mediante "chain shuffling".**

Per aumentarne l'affinità, l'anticorpo TS-A12 fu sottoposto a sostituzione ("shuffling") delle catene leggere VL. A questo scopo il DNA del fagmide fu tagliato con BssHII e Sall per excidere la regione VL. La sostituzione di tale regione fu ottenuta con tutto il repertorio delle catene VL di una libreria preimmune (Sblattero, D., e Bradbury A., 2000, *Nat. Biotechnol.* 18:75) preparata con gli stessi enzimi. La libreria fu sottoposta a tre cicli di selezione sull'antigene, come descritto negli esempi 1 e 2 fino ad ottenere una serie di anticorpi specifici contro C5, tra cui il TS-A12/22 avente una costante di dissociazione, misurata con BIACORE 2000 secondo il metodo descritto nell'esempio precedente, pari a  $1.8 \times 10^{-8}$  M con un incremento, quindi dell'affinità molare pari a circa un ordine di grandezza.

**Esempio 6. Caratterizzazione dell'inibizione della conversione di C5 a C5a da parte degli anticorpi scFv antiC5.**

I frammenti scFv anti-C5 ottenuti furono ulteriormente caratterizzati per la loro capacità di inibire l'attività emolitica di C5, o in altre parole, di bloccare la conversione del componente C5 a C5a. Allo scopo, una piccola quantità di componente C5 purificato fu incubato per 30' a RT, con gli anticorpi scFv anti-C5 purificati, oppure con un scFv non



correlato (anti-gliadina), oppure con VBS (Veronal Buffered Saline), come controllo. La miscela fu quindi aggiunta agli eritrociti di montone sensibilizzati con IgM di coniglio (EA) in quantità subagglutinanti (vedi Harrison, R. A., and P. J. Lachmann. 1986. Complement technology. In *Handbook of Experimental Immunology*. D. M. Weir, L. A. Herzemberg, C. Blackwell, and A. Herzemberg Leonore, eds. Blackwell Scientific Publ, London) rivestiti con i componenti da C1 fino a C3b (EAC1-3b) che permettono di rivelare l'attivazione del C5 attraverso la via classica. La sospensione eritrocitaria era risospesa in siero depletato di C5 (C5D), ed incubata per 30' a 37°C. Alla fine fu misurata la lisi cellulare come percentuale sul controllo di lisi totale in H<sub>2</sub>O distillata (vedi figura 1 pannello B).

L'inibizione della produzione di C5a e di TCC da parte dei scFv TS-A12 e TS-A12/22 fu misurata mediante ELISA utilizzando l'anticorpo monoclonale 17/5 come anticorpo di cattura e l'anticorpo G25/2 come anticorpo di rivelazione secondo quanto descritto in Opperman et al., 1991, *Complement Inflamm.* 8:13. La presenza di TCC fu misurata utilizzando l'anticorpo aE11 come anticorpo di cattura e un anticorpo biotinilato anti-C5 (Sigma Aldrich) seguito da streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina come descritto da Tedesco et al. 1997, *J Exp. Med.* 185:1619.

I risultati del saggio sono presentati in Figura 1, dove è mostrato che gli anticorpi TS-A12 e TS-A12/22 inibiscono quasi completamente la formazione di C5a (Fig. 1A) (via classica), e TCC (Fig. 1B) mentre gli altri scFv isolati sono solo parzialmente o limitatamente efficaci. La



presenza di VBS o di un scFv non correlato nella miscela di reazione non dimostrava, come atteso, alcun effetto inibitorio.

**Esempio 7. Determinazione della sequenza dell'anticorpo TS-A12/22.**

Il frammento VH e VL dei cloni positivi fu confrontato con le sequenze anticorpali note pubblicate in banca dati VBASE (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html>). La catena pesante VH dell'anticorpo TS-A12/22 risultò derivare dalla catena VH3/V-48 e la catena leggera dalla Vλ3/V2-14. La sequenza di DNA codificante per l'anticorpo scFv TS-A12/22 è riportata nell'allegato sequenze come seq IDN5 e la sequenza amminoacidica derivata come seq IDN6.

**Esempio 8. Mappatura del sito di riconoscimento dell'anticorpo TS-A12/22 sulla molecola di C5.**

In prima istanza fu caratterizzato se l'anticorpo TS-A12/22 riconoscesse la subunità alfa o beta del componente C5 del complemento, preparate come descritto in Materiali, mediante la tecnica del Western-blotting. In breve, le due subunità furono fatte migrare elettroforeticamente in pozzetti separati e trasferite su membrane di nitrocellulosa. Dopo aver bloccato i siti aspecifici con Tris 50 mM pH 7.6, contenente 0.5 M NaCl e 4% latte in polvere scremato per 1 ora a 37°C, furono rivelate mediante incubazione con un'opportuna diluizione dell'anticorpo TS-A12/22 per 1 ora a 37°C e successiva incubazione con un'anticorpo secondario marcato con fosfatasi alcalina, oppure con streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina (Sigma-Aldrich). La reazione enzimatica fu sviluppata con blu di tetrazolio e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Sigma-Aldrich,



0.30 mg/ml) diluito in 0.1 M Tris-HCl pH 9.5 contenente 0.1 M NaCl e 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Come marcatori di peso molecolare furono utilizzati i Rainbow RPN 756 (Amersham Italia). Come appare dalla figura 2,

l'anticorpo TS-A12/22 secondo l'invenzione riconosce la subunità alfa, caricata in corsia 1 e non quella beta del fattore C5, caricata in corsia 2.

Poiché l'anticorpo TS-A12/22 purificato mostrava anche inibizione dell'attività emolitica legata all'inibizione della conversione di C5 a C5a, come dimostrato nell'esempio 9, fu verificata l'ipotesi che l'anticorpo riconoscesse quale sito di legame il sito di taglio della C5 convertasi.

Per verificare ciò fu sintetizzato un peptide di 18 amminoacidi di sequenza: KDMQLGR<sup>↓</sup>LHMKTLLPVSK (P5A-18 anche denominato C5cs), corrispondente alla regione 727-744 della proteina matura e comprendente il sito di taglio della C5 convertasi (indicato con una freccia), situato tra la glicina 733 ed arginina 734 secondo la numerazione utilizzata da SwissProt per il C5 umano (seqID P01031). Il peptide fu utilizzato in un saggio ELISA competitivo su proteina C5 in fase solida. L'anticorpo TS-A12/22 venne preincubato prima del legame alla fase solida con il peptide P5A-18, corrispondente agli aa 727-744 del componente C5 oppure con un peptide non correlato, di sequenza GEEIQIGHIPREDVDYHLYP (corrispondente ad un peptide derivato dalla fibronectina e denominato CS5).

In figura 3 sono mostrati i risultati ottenuti: il peptide P5A-18 inibiva il legame dell'anticorpo TS-A12/22 a C5, e questa inibizione era dose-dipendente passando dal 45% al 90% a concentrazioni di peptide di 200 e 800 ng/200 µl rispettivamente e confermando che l'anticorpo TSA-



12/22 riconosce proprio questa regione sul fattore C5 attivato. I valori di concentrazione corrispondono ad una  $K_i$  per il peptide di  $1\mu M$ , non molto differente dalla  $K_D$  misurata per la proteina intera mediante SPR, secondo quanto descritto nell'esempio 4.

Come atteso sia il peptide non correlato, CS5, che la proteina C5 intera risultarono inefficaci nell'inibire il legame dell'anticorpo TSA-12/22 al C5 attivato, anche alle concentrazioni più alte, indicando che l'inibizione del peptide C5cs (P5A-18) era specifica per la catena alfa del C5.

**Esempio 9. Caratterizzazione funzionale dell'anticorpo TS-A12/22.**

**Inibizione dell'attività emolitica e dell'attivazione del TCC.**

Avendo verificato le caratteristiche di inibizione dell'anticorpo TS-A12/22 sulla via classica di attivazione del fattore C5, fu verificato se, e a quale livello, vi fosse inibizione anche sulla via alternativa di attivazione del C5.

Il saggio fu effettuato utilizzando eritrociti di coniglio come cellule bersaglio, secondo metodiche note. In breve, quantità crescenti di C5 furono mescolate con 600 ng dell'anticorpo scFv dell'invenzione oppure con un scFv non correlato, oppure con GVBS, in cui furono discolti gli scFv, e quindi incubati 15' a temperatura ambiente o con una sospensione all'1% di emazie di montone sensibilizzate con anticorpo di coniglio e rivestite da componenti complementari fino a C3b, EAC1-3b, per valutare la via classica di attivazione del complemento, oppure con eritrociti di coniglio all'1% per valutare la via alternativa di attivazione del complemento.

A ciascuna delle sospensioni eritrocitarie fu aggiunto un siero depletato di C5 e diluito 1/200. Dopo 30' d'incubazione a  $37^\circ C$ , fu misurata la



percentuale di lisi eritrocitaria rispetto al 100 % ottenuto lisando le emazie con ugual volume di  $H_2O$  distillata ed al bianco ottenuto sospendendo le emazie in GBVS. La lettura spettrofotometrica fu effettuata a 412 nm ed i risultati sono riportati in figura 4: inibizione della lisi di EAC1-3b per via classica (Pannello A); inibizione della lisi di eritrociti di coniglio per via alternativa (Pannello B). L'anticorpo TS-A12/22 inibisce la lisi degli eritrociti di coniglio inibendo la conversione del C5 in modo simile sia attraverso la via classica che attraverso la via alternativa.

Poiché la sequenza amminoacidica corrispondente al sito di taglio della convertasi sulla catena alfa del C5 è conservata in varie specie animali, fu inoltre valutata la capacità dell'anticorpo TS-A12/22 di inibire la conversione di C5 a C5a, oltre che nel siero umano, anche nel siero di coniglio, ratto e topo, mediante il saggio emolitico.

L'anticorpo TS-A12/22 si rivelò in grado di inibire l'attività emolitica del siero di tutte le specie animali saggiate, anche se con efficienza diversa. I risultati sono presentati in figura 5, dove è mostrato che l'efficienza di inibizione su siero di ratto è praticamente simile a quella su siero umano, mentre risultò maggiore l'efficienza su siero di coniglio o di topo, anche considerando che per indurre una percentuale di lisi comparabile con quella indotta con C5 umano è necessaria una quantità di siero di coniglio più alta.

(La specificità dell'anticorpo TS-A12/22 fu valutata anche verso altri componenti della cascata del complemento, ad esempio C3 e C4, strutturalmente simili a C5, senza che fosse evidenziata alcun tipo di



cross-reattività).

#### **Esempio 10. Uso dell'anticorpo TS-A12/22 *in vivo*.**

Per provare l'effetto *in vivo* dell'anticorpo TS-A12/22, fu misurato l'afflusso di PMN nell'articolazione di ratto iniettata con BSA, BSA con TS-A12/22 e BSA con anticorpo non correlato. Fu così dimostrato che la chemiotassi dei PMN e cioè il loro numero nel liquido di lavaggio dell'articolazione in presenza di TS-A12/22 è significativamente ridotta rispetto a quella dei ratti trattati con BSA oppure con BSA e anticorpo non correlato (Figura 6). Inoltre, fu controllata, in immunofluorescenza su una sezione istologica di articolazione dell'arto posteriore dei ratti trattati, la deposizione di componenti complementari C3 e C9 mediante uso di antisieri specifici e un antisiero secondario coniugato con fluoresceina (Figura 7). Fu evidenziato che mentre la deposizione di C3 restava inalterata in seguito alla somministrazione di BSA con anticorpo TS-A12/22 o anticorpo non correlato, la deposizione di C9 era fortemente inibita in presenza di TS-A12/22. Fu così confermato che la cascata complementare è inibita dall'anticorpo TSA-12/22 a livello intermedio tra C3 e C9 e quindi a livello della conversione di C5 in C5a+C5b.

#### **Conclusioni**

Sebbene tutti gli anticorpi scFv isolati come descritto nell'esempio 1 si dimostrarono in grado di legare il fattore C5 come verificato attraverso ELISA, e come previsto dato il tipo di selezione o "panning" delle particelle fagiche effettuato su C5, non tutti si dimostrarono in grado di inibire la conversione di C5 a C5a + C5b e di inibire pertanto le funzioni



biologiche attivate da essi.

L'anticorpo TSA12/22, invece, legandosi in prossimità del sito di taglio della C5 convertasi sulla catena alfa del componente C5 attivato, ed impedendo la produzione di C5a e C5b, inibisce sia l'attività chemiotattica indotta dal primo che l'attività emolitica mediata dal C5b attraverso la formazione del MAC. L'inibizione opera a valle dell'attivazione del componente C3, ed è pertanto indipendente dal tipo di via di attivazione del complemento utilizzata (classica o alternativa).



AB

## ALLEGATO SEQUENZE

<110> Università degli Studi di Trieste  
 Consiglio Nazionale Ricerche (CNR)  
  
 <120> Anticorpi anti componente C5 del complemento e loro uso  
 <130> 2728  
 <160> 15  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 342  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(342)  
 <223> Catena leggera dell'anticorpo TS-A12/22  
  
 <400> 1  
 gac atc cgg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc 48  
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc 96  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
  
 tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag 144  
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
  
 cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc 192  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
  
 cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc 240  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
  
 atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa 288  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
  
 tat tat agt act cct cag ctc act ttc ggc gga agg acc aaa gtg gat 336  
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys. Val Asp  
 100 105 110  
  
 atc aaa 342  
 Ile Lys  
  
 <210> 2  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
  
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp  
 100 105 110

Ile Lys

<210> 3  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(345)  
 <223> catena pesante dell'anticorpo TS-A12/22

<400> 3  
 cag gta cag ctg cag cag tca gag gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

ggc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

tca tac att agt agt agt agt acc ata tac tac gca gac tct gtg 192  
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gcg aga ggg cct ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc 336  
 Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 100 105 110

gtc tcc tca 345  
 Val Ser Ser  
 115

JP

<210> 4  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 5  
 <211> 750  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(750)  
 <223> scFv

<400> 5  
 gac atc cgg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc 48  
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc 96  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30

tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag 144  
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc 192  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc 240

2728PTIT

Notarbartolo &amp; Gervasi S.p.A.

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa 288  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

tat tat agt act cct cag ctc act ttc ggc gga agg acc aaa gtg gat 336  
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp  
 100 105 110

atc aaa tcc gga ggg tcg acc ata act tcg tat aat gta tac tat acg 384  
 Ile Lys Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr  
 115 120 125

aag tta tcc tcg agc ggt acc cag gta cag ctg cag cag tca gag gga 432  
 Lys Leu Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly  
 130 135 140

ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct 480  
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 145 150 155 160

gga ttc acc ttc agt agc tat ggc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca 528  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 165 170 175

ggg aag ggg ctg gag tgg gtt tca tac att agt agt agt agt agt acc 576  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr  
 180 185 190

ata tac tac gca gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac 624  
 Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 195 200 205

aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag 672  
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 210 215 220

gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga ggg cct ggt atg gac gtc tgg 720  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp  
 225 230 235 240

ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 750  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 6  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45



2728PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp  
100 105 110

Ile Lys Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr  
115 120 125

Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly  
130 135 140

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
145 150 155 160

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr  
180 185 190

Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
195 200 205

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp  
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
245 250

<210> 7  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> homo sapiens  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(15)  
<223> regione CDR1 della VH

<400> 7  
agc tat ggc atg aac  
Ser Tyr Gly Met Asn  
1 5

15

AS

<210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 8

Ser Tyr Gly Met Asn  
 1 5

<210> 9  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(51)  
 <223> regione CDR2 della VH

<400> 9  
 tac att agt agt agt agt acc ata tac tac gca gac tct gtg aag  
 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

48

ggc 51  
 Gly

<210> 10  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 10

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(18)  
 <223> regione CDR3 della VH

<400> 11  
 ggg cct ggt atg gac gtc  
 Gly Pro Gly Met Asp Val  
 1 5

18



2728PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

<210> 12  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 12

Gly Pro Gly Met Asp Val  
1 5

<210> 13  
<211> 63  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> linker  
  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(63)  
<223> linker VL-VH

<400> 13  
tcc gga ggg tcg acc ata act tcg tat aat gta tac tat acg aag tta 48  
Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu  
1 5 10 15

tcc tcg agc ggt acc 63  
Ser Ser Ser Gly Thr  
20

<210> 14  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> artificial sequence  
<220>  
<223> linker  
  
<400> 14

Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu  
1 5 10 15

Ser Ser Ser Gly Thr  
20

<210> 15  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Peptide comprendente il sito di taglio della C5 convertasi sul co-  
mponente C5 del complemento. Corrispondente agli aa 727-744 della  
proteina matura umana (P01031)

<400> 15

Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val  
1 5 10 15

Ser Lys

**RIVENDICAZIONI**

1. Anticorpo umano avente specificità per il componente C5 attivato del complemento e caratterizzato dal fatto di inibire la conversione della catena C5 alfa in C5a e C5b.
2. Anticorpo ricombinante secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che l'epitopo riconosciuto da tale anticorpo comprende il sito di proteolisi della C5 convertasi sulla catena alfa del componente C5 del complemento.
3. Anticorpo secondo la rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto di riconoscere un polipeptide avente almeno l'80% di omologia con il peptide comprendente la regione corrispondente alla sequenza 731-740 del componente C5 del complemento umano, preferibilmente con il peptide KDMQLGR<sup>↓</sup>LHMKTLLPVSK.
4. Anticorpo secondo la rivendicazione 3 dove il componente C5 è di mammifero, preferibilmente scelto tra: umano, murino, di ratto, di coniglio.
5. Anticorpo secondo le rivendicazioni 1-4 caratterizzato dal fatto di essere ricombinante.
6. Anticorpo ricombinante secondo la rivendicazione 5 caratterizzato dal fatto di essere in formato a catena singola (scFv) comprendente una regione variabile della catena leggera unita covalentemente con una regione variabile della catena pesante.
7. Anticorpo secondo la rivendicazione 6 caratterizzato dal fatto che la catena leggera è la catena lambda, preferibilmente Vλ3/V2-14 oppure la catena kappa, preferibilmente Vk4/DPK24, e la regione

*10/11/2015*

variabile della catena pesante è la regione VH3, preferibilmente VH3/V-48.

8. Anticorpo secondo la rivendicazione 7 caratterizzato dal fatto di comprendere almeno una delle sequenze amminoacidiche scelte tra: seq ID n° 2, 4, 6.
9. Anticorpo ricombinante secondo la rivendicazione 8 avente sequenza amminoacidica corrispondente alla sequenza ID n° 6.
10. Anticorpo ricombinante secondo la rivendicazione 8 caratterizzato dal fatto di comprendere entrambe le sequenze amminoacidiche identificate come seqID n° 2 e seqID n° 4, oppure le loro varianti alleliche o le loro mutazioni conservative.
11. Anticorpo ricombinante secondo la rivendicazione 5 caratterizzato dal fatto di comprendere un polipeptide avente un'omologia di almeno il 95% con almeno una delle sequenze amminoacidiche corrispondenti alle sequenze seqID n° 2, seqID n° 4 o seq IDn°6.
12. Proteina ricombinante chimerica caratterizzata dal fatto di comprendere almeno una delle sequenze corrispondenti alle sequenze IDN: 2, 4, 6, 8, 10,12 o sequenze proteiche aventi almeno il 95 % di omologia con tali sequenze.
13. Sequenze nucleotidiche isolate codificanti per gli anticorpi secondo le rivendicazioni 1-11.
14. Sequenze nucleotidiche secondo la rivendicazione 13 caratterizzate dal fatto di comprendere almeno una delle sequenze scelte tra: seqID n°1 o 3 o 5, 7, 9, 11.
15. Vettori comprendenti le sequenze nucleotidiche di cui alle



rivendicazioni 13 e 14.

16. Vettori secondo la rivendicazione 15 caratterizzati dal fatto di essere vettori di espressione in batteri, lieviti, o cellule di eucarioti superiori.
17. Anticorpi secondo le rivendicazioni 1-11 o proteine secondo la rivendicazione 12 per uso terapeutico o diagnostico.
18. Sequenze nucleotidiche secondo le rivendicazioni 13-14 o vettori secondo le rivendicazioni 15-16 per uso terapeutico o diagnostico.
19. Uso degli anticorpi o delle proteine di cui alla rivendicazione 17 per la preparazione di farmaci per la prevenzione ed il trattamento di patologie legate ad una iperattivazione del sistema del complemento.
20. Uso delle sequenze nucleotidiche di cui alla rivendicazione 18 per la preparazione di farmaci per il trattamento delle patologie legate ad una iperattivazione del sistema del complemento.
21. Uso secondo le rivendicazioni 19 e 20 caratterizzato dal fatto che tali patologie sono dovute a iperproduzione di Terminal C Complex.
22. Uso secondo la rivendicazione 19 e 20 per la preparazione di farmaci per il trattamento o la prevenzione di malattie infiammatorie croniche e acute.
23. Uso secondo la rivendicazione 22 caratterizzato dal fatto che la malattia cronica è scelta tra: artrite reumatoide, glomerulonefrite, sclerosi multipla, neuropatie periferiche demielinizzanti, aterosclerosi.
24. Uso secondo la rivendicazione 22 caratterizzato dal fatto che la malattia acuta è scelta tra: Multiple Organ Failure, infarto del miocardio.



25. Uso secondo la rivendicazione 22 per la preparazione di farmaci per il trattamento dei danni al miocardio da riparazione per ischemia.
26. Composizioni farmaceutiche comprendenti quale principio attivo almeno uno degli anticorpi secondo le rivendicazioni 1-11 o delle proteine secondo la rivendicazione 12 o delle sequenze nucleotidiche secondo le rivendicazioni 13-14 in combinazione con opportuni eccipienti e/o diluenti.
27. Procedimento per la selezione di anticorpi anti-C5 dotati della capacità di inibire la formazione di C5a da C5 caratterizzato dal fatto di comprendere un primo ciclo di selezione sull'antigene C5 ed un secondo ciclo di selezione mediante inibizione del saggio emolitico su SRBC.
28. Procedimento per la preparazione degli anticorpi o delle proteine ricombinanti di cui alle rivendicazioni 1-12.
29. Uso degli anticorpi secondo le rivendicazioni 1-11 o delle sequenze nucleotidiche secondo le rivendicazioni 13-14 per la messa a punto di un modello animale di patologie legate ad una iperattivazione del sistema del complemento.
30. Kit comprendente almeno uno degli anticorpi secondo le rivendicazioni 1-11 o almeno una delle sequenze nucleotidiche secondo le rivendicazioni 13-14.
31. Procedimento per la selezione di inibitori della conversione del componente C5 del complemento attivato nei suoi frammenti biologicamente attivi caratterizzato dal fatto di utilizzare gli anticorpi o le proteine secondo le rivendicazioni 1-12.



2728PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

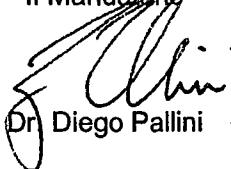
32. Animali transgenici non umani caratterizzati dal fatto di esprimere le sequenze nucleotidiche di cui alle rivendicazioni 13-14.

(SM/pd/lm) *SM*

Milano, il 11 Luglio.2002

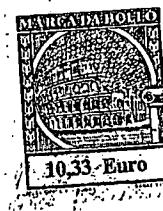
p. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Il Mandatario



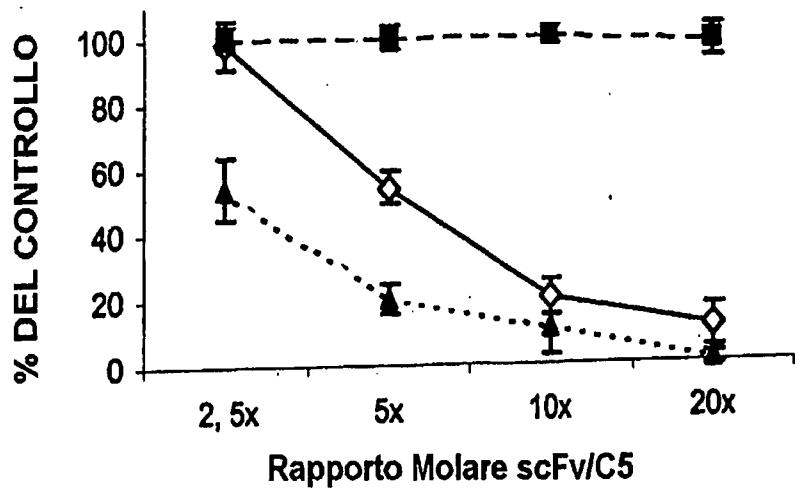
Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

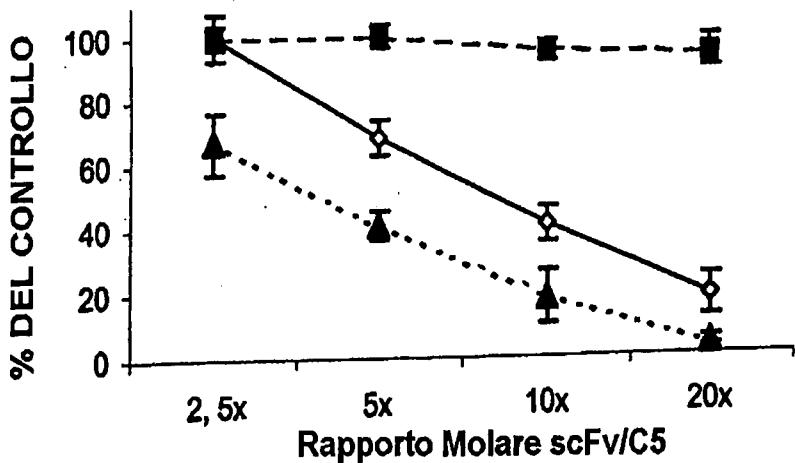


*John*

**A**



**B**



MI 2002 A 0 0 1 5 2 7

**FIGURA 1**



NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

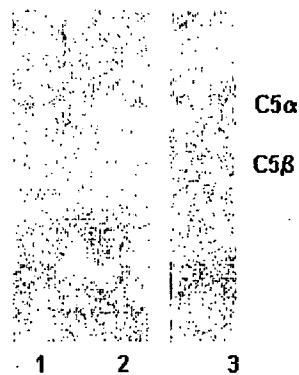
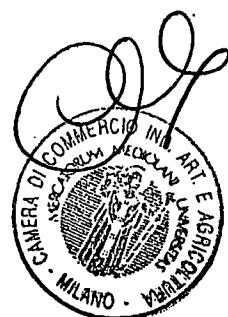


Fig. 2

MI 2002 A 001527



*John*

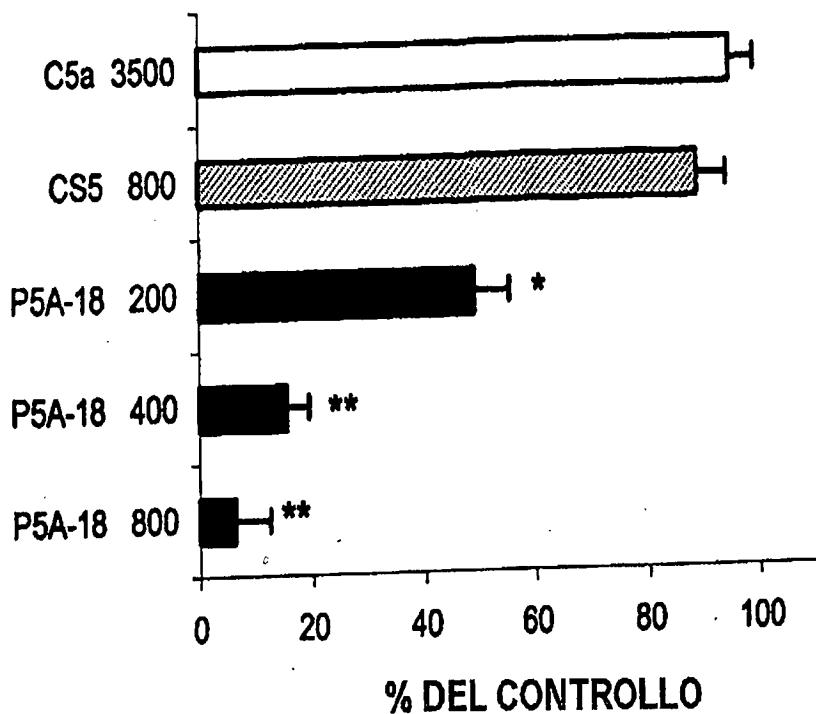
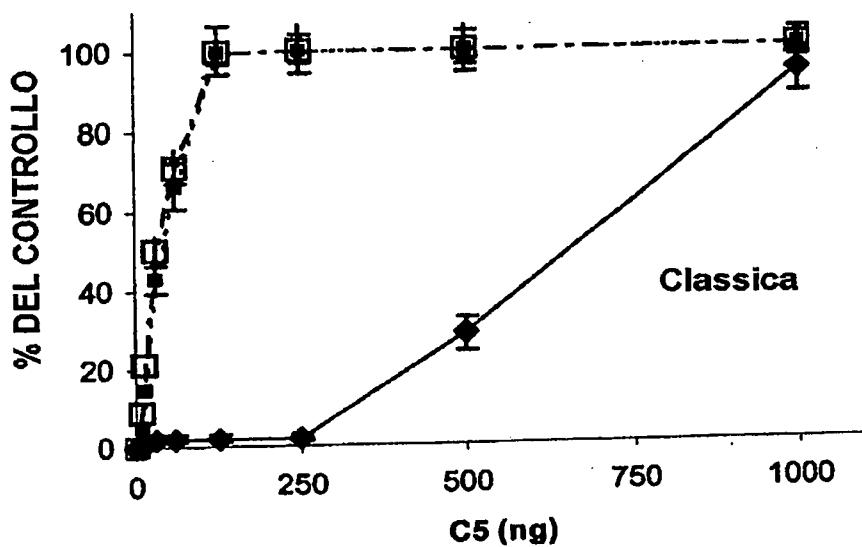
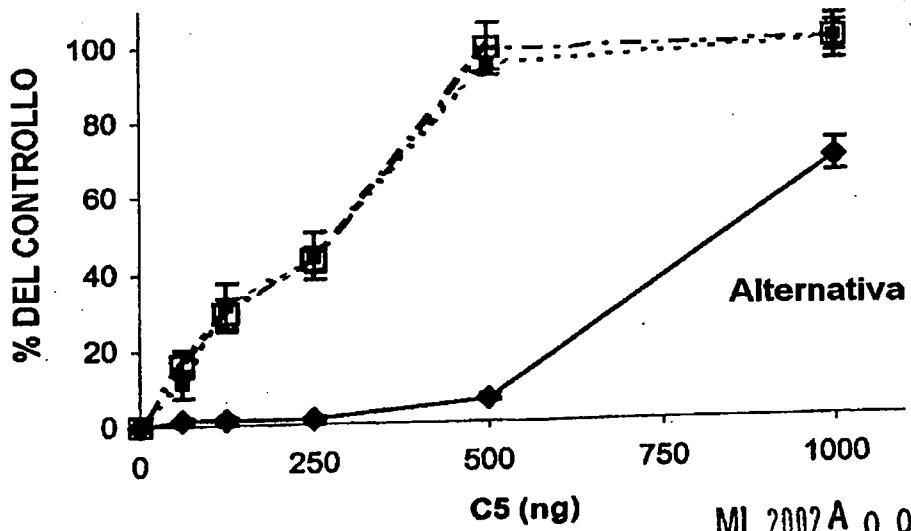


FIGURA 3

MI 2002A 001527



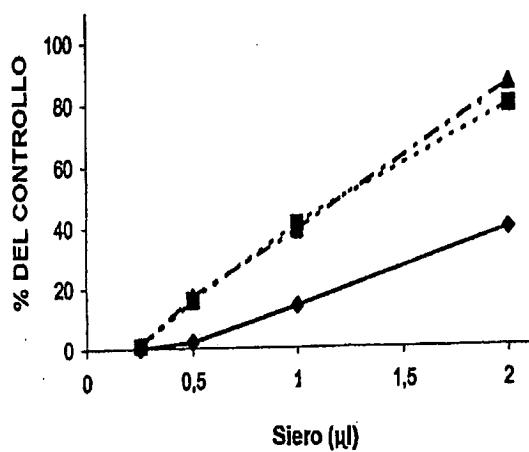
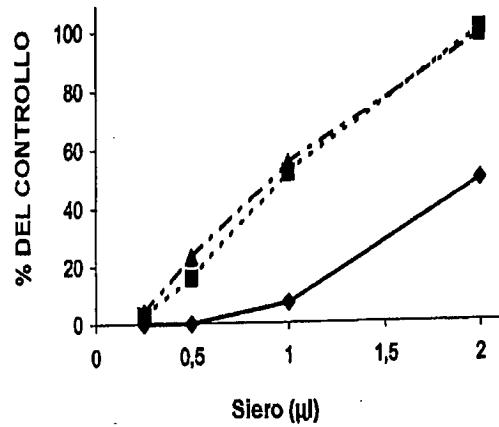
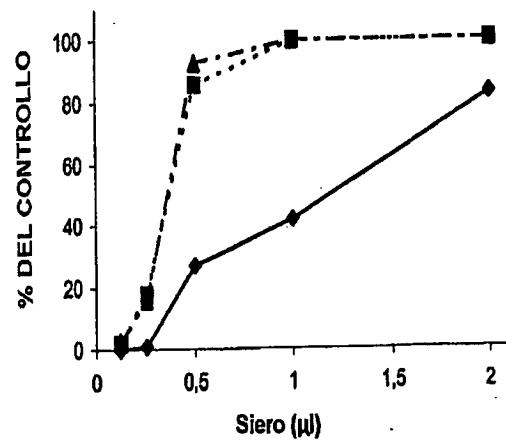
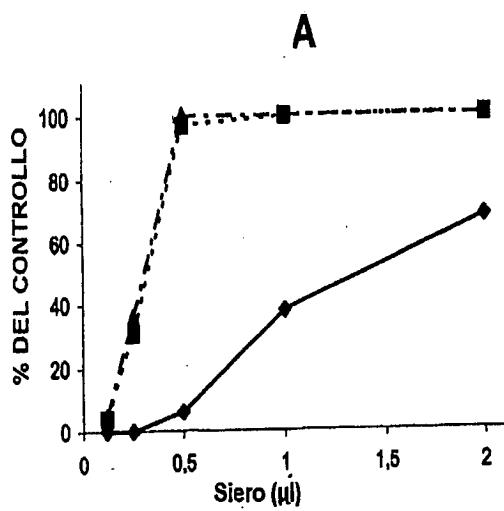
*John***A****B**

MI 2002 A 0 0 1 5 2 7

**FIGURA 4**

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

B



MI 2002A 001527

FIGURA 5



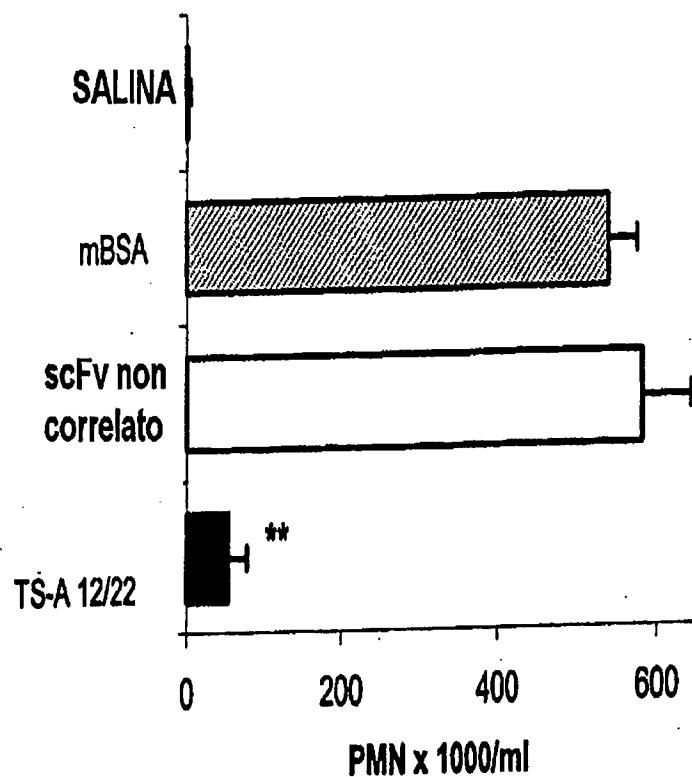
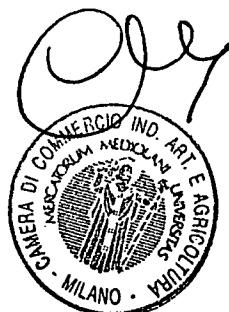
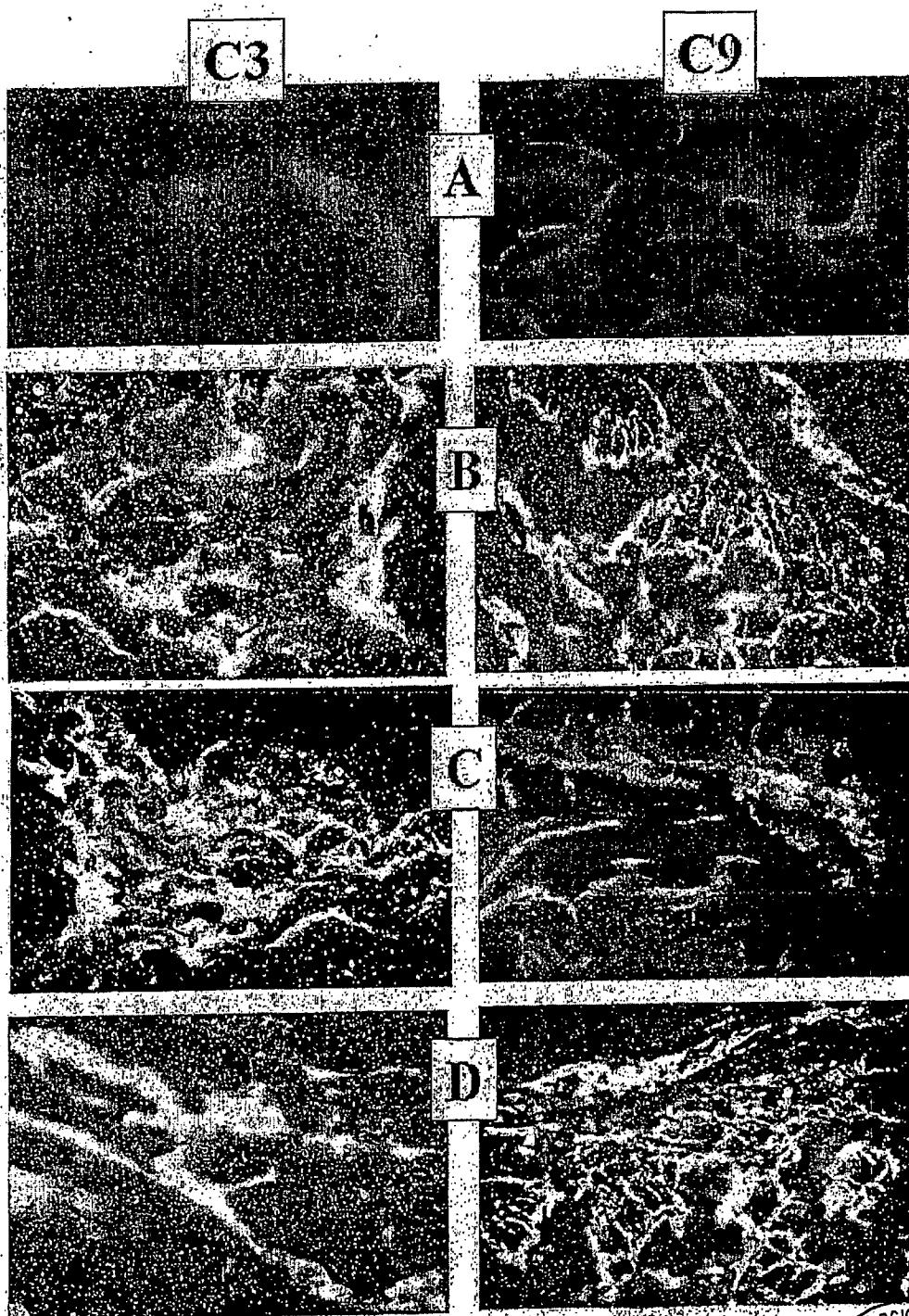


FIGURA 6

MI 2002A 001527



*[Handwritten signature]*



MI 2002 A 001527

FIGURA 7

